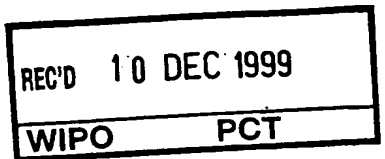


09/831182

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI.IT 99/356
4

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.
N. RM98 A 000694

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)Roma, li 31 AGO. 1999

IL REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

D.ssa Paola DI CINTIO

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE. ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.p.A. codice 01850891001
Residenza POMEZIA (ROMA) ITALIA I
2) Denominazione _____ codice _____
Residenza _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome de Benedetti Fabrizio ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.
via Piazza di Pietra n. 0039 città ROMA cap 00186 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____
"CELLULE PER LA PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI DIFETTIVI, METODO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USO".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) COLLOCA Stefano

3)

2)

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI. denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 52
Doc. 2) 2 PROV n. tav. 01
Doc. 3) 0 55
Doc. 4) 0 RIS
Doc. 5) 0 RIS
Doc. 6) 0 RIS
Doc. 7) 0

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, ~~procedura di deposito~~ procedura di deposito

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

novecentoquindicimila=

8) attestati di versamento, totale lire

COMPILATO IL 06 11 1998

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA SINO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

obbligatorio

Gilberto Tonon

(Isr. Albo n. 83 BM)

ROMA

codice 58

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 98A000694

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

L'anno millenovecento

novantotto

il giorno

Sei

del mese di

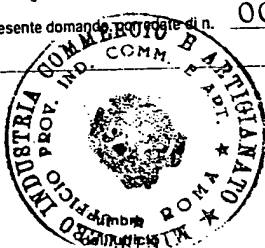
Novembre

il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Massimo



L'Ufficiale Rogante

Silvia Altieri

L'UFFICIALE ROGANTE

RM 98A000694

SIB-91824

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

N° DOMANDA

REG.A

DATA DEP. - 6 NOV. 1998

N° BREVETTO

DATA RIL.

D. TITOLO

"CELLULE PER LA PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI
DIFETTIVI, METODO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO
USO"

L. RIASSUNTO

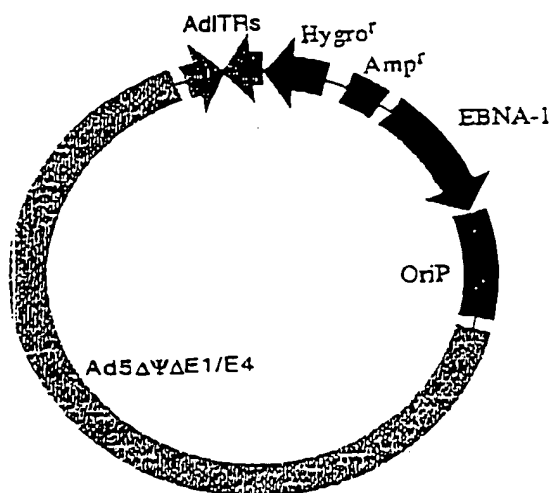
La presente invenzione ha per oggetto cellule utilizzabili per la produzione di di vettori adenovirali difettivi in assenza di ulteriori "helper", in quanto contenenti unità geniche capaci di esprimere le funzioni necessarie per il compimento del ciclo virale assenti in tali vettori. La presente invenzione comprende inoltre il metodo per la produzione di dette cellule, il loro uso per la produzione di vettori adenovirali ed i vettori adenovirali così ottenuti.



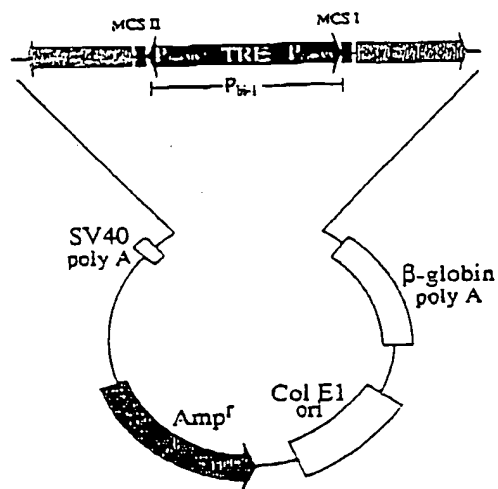
S.I.B.
ROMA

M. DISEGNO

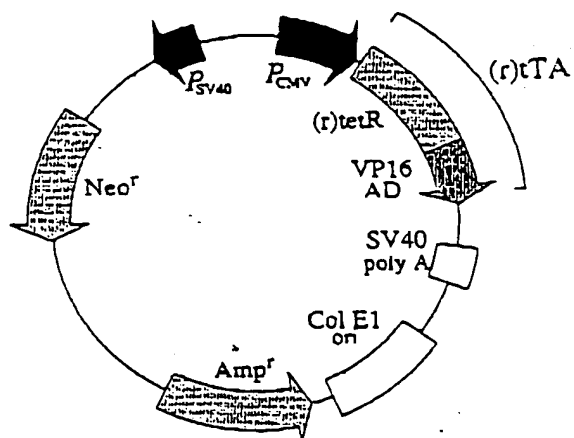
A) Diagramma del vettore Ad5 "shuttle"



B) Diagramma del vettore E1/E4



C) Diagramma del vettore pTet-On/Off



D) Diagramma del vettore pTet-KRAB

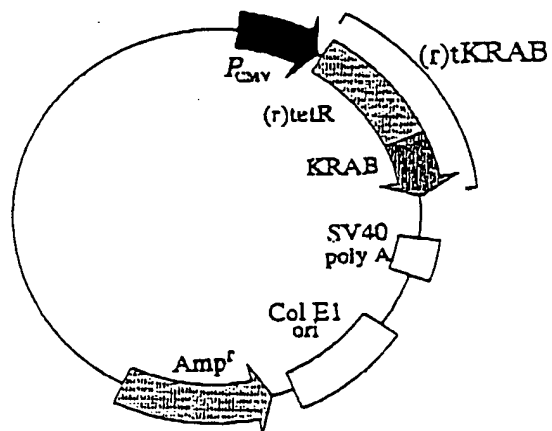


Fig. 1

RM 98A000694

SIB-91824

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE INDUSTRIALE dal titolo:

"CELLULE PER LA PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI
DIFETTIVI, METODO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO
USO"

della Ditta Italiana ISTITUTO DI RICERCHE DI
BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.p.A. con sede a
POMEZIA (ROMA).



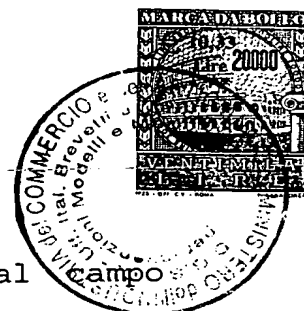
DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è riferita al
della terapia genica ed in particolare all'uso ed
allo sviluppo di vettori di origine virale e di
linee cellulari per la loro produzione e più
specificamente alla possibilità di preparare in
quantità sufficienti per uso terapeutico, vettori
virali derivati da adenovirus.

Stato dell'arte

Un aspetto importante nello sviluppo della
terapia genica è lo sviluppo di vettori capaci di
veicolare materiale genetico alle cellule
bersaglio. Per essere efficaci questi vettori
devono possedere diverse caratteristiche: devono



S.I.B.
ROMA

avere la capacità di accomodare transgeni grandi o multipli, inclusi di elementi di regolazione genica, ma restare di semplice manipolazione, tale da permetterne la produzione su scala farmaceutica. E indispensabile poi che siano sicuri e a bassa tossicità, pur mantenendo la capacità di veicolare i transgeni in modo efficiente e selettivo ai tessuti bersaglio. Infine è preferibile che il vettore sia compatibile con una appropriata ritenzione, espressione e regolazione del transgene nella cellula bersaglio.

I vettori di tipo virale basati sull'uso di adenovirus sembrano essere attualmente quelli che più si prestano a manipolazioni tali da renderli capaci di soddisfare tutte queste esigenze, e sono attualmente considerati il più efficiente sistema per introdurre geni eterologhi in cellule di mammifero sia in vivo che in cellule coltivate in vitro (Hitt M.M. et al.1997. Advances in Pharmacol.40, 137-206).

Gli adenovirus (Ad) virus sono una famiglia di virus a DNA, caratterizzati da un capsido icosaedrico e privo di rivestimento esterno. Quelli che infettano l'uomo sono stati classificati in 57 sierotipi, sono abbondantemente diffusi in tutto il

mondo, tanto che si stima che nei bambini di età inferiore ai 5 anni, circa il 5% delle malattie acute dell'apparato respiratorio sono causate da Ad. La stragrande maggioranza delle infezioni da Ad ha però decorso subclinico e si manifesta solamente con la formazione di anticorpi specifici.

Gli Ad-virus hanno ricevuto particolare attenzione come potenziali vettori per terapia genica per alcune loro caratteristiche interessanti: sono altamente infettivi ma relativamente innocui, infettano primariamente cellule epiteliali, ma possono infettare anche cellule altri tessuti che siano o meno in fase di replicazione attiva. In vitro sono altamente infettivi di linee cellulari di origine umana, si possono quindi facilmente produrre in grandi quantità. E' stato poi dimostrato che inserti di DNA umano possono essere efficientemente trasferiti in cellule epiteliali umane mediante infezione con Ad (Horvitz, "Adenoviridae and their replication" in Virology, Field and Knipe, eds. Raven Press, NY; 1990; pg. 1679-1740).

Ad è stato ampiamente caratterizzato nei 40 anni che sono seguiti al suo primo isolamento facilitando le modificazioni che lo hanno reso un

efficiente veicolo per il trasferimento di materiale genetico.

L'adenovirus umano (Ad) ha un genoma a doppio filamento lineare di DNA, di circa 36kb, suddiviso in due regioni che codificano polipeptidi espressi nelle prime fasi di infezione (regione E), cioè prima della replicazione del DNA virale, e nelle fasi successive del ciclo virale (regione L). In seguito ad infezione di una cellula competente, quando il DNA virale raggiunge il nucleo, la prima regione ad essere trascritta è la regione E1a che codifica per proteine coinvolte nella transattivazione delle altre regioni, sia E che L, del DNA virale. La seguente regione E1b codifica per proteine che regolano la sintesi di RNA sia virale che della cellula ospite e che proteggono quest'ultima dall'effetto apoptotico altrimenti esercitato da E1a. Le funzioni di E1a/E1b sono quindi essenziali per la replicazione virale.

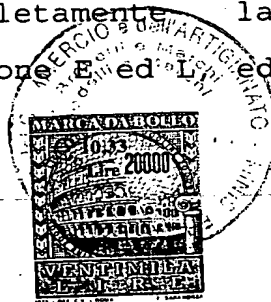
La regione E2 codifica per proteine direttamente coinvolte nella replicazione virale, come la DNA-polimerasi virale, la proteina pre-terminale e proteine che si legano al DNA virale. La regione E3 codifica per proteine che non sono necessarie per la replicazione virale in cellule di

coltura, ma sono implicate, in vivo, nel controllo della risposta immune antivirale. La regione E4 infine contiene gruppi di geni i cui prodotti riducono l'espressione di geni della cellula ospite e aumentano la trascrizione della regione E2 ed L del genoma virale.

La regione L del genoma virale codifica essenzialmente per proteine di tipo strutturale o comunque coinvolte nell'assemblaggio delle particelle virali.

I vettori adenovirali più utilizzati al momento derivano dai sierotipi umani 2 e 5 e sono definiti vettori di prima generazione. Essi sono stati ottenuti per delezione della regione E1, rendendo il virus difettivo per la capacità di replicare a meno che le proteine prodotte da tale unità trascrizionale non siano fornite in trans. La delezione della regione E1 consente perciò di limitare la propagazione dei virus ricombinanti in linee cellulari che complementano tale difetto perchè esprimono costitutivamente geni della regione E1 del virus.

La sola delezione di E1 non è comunque sufficiente ad eliminare completamente la espressione di altri geni della regione E ed L ed



a prevenire la replicazione del DNA virale. Ne consegue che in animali infettati con questi vettori si riscontra la presenza di antigeni virali e l'insorgenza di risposte immunitarie che tendono alla distruzione delle cellule infettate (Yang et al. Proc. Natl Acad Sci. 91:4407-4411; 1994). Questo porta alla perdita del transgene di interesse terapeutico ed alla insorgenza di infiammazioni. Per di più la persistenza di una memoria immunologica di queste reazioni può grandemente diminuire l'efficacia di una seconda amministrazione di un vettore adenovirale di questo tipo (Kozarsky et al. J. Biol. Chem. 269:1-8; 1994).

Allo scopo poi di aumentare la capacità del genoma virale di accettare l'inserimento di geni eterologhi, oltre alla delezione della regione E1 sono stati preparati vettori con ulteriori delezioni in E2 (Englehardt et al. Proc. Natl Acad Sci. 91:6196-6200; 1994) E3 (Bett et al. Proc. Natl Acad Sci. 91:8802-8806; 1994) ed E4 (Yeh, P., et al (1996) J. Virol. 70 559-565). Tuttavia la capacità massima di un vettore adenovirale di prima generazione non supera le 8 kb mentre quella di un vettore $\Delta E1/E3/E4$ raggiunge le 11 kb ed i geni

estranei possono essere indifferentemente inseriti nella regione E1 o E3.

In seguito alla scoperta che una parte minima, circa 600 paia di basi, del DNA virale è strettamente necessaria per la replicazione e l'incapsidamento di vettori ricombinanti, sono stati sviluppati vettori adenovirali totalmente difettivi, dipendenti per la loro replicazione e assemblaggio in particelle virali dalla presenza di virus "helper".

Una strategia proposta per la preparazione di vettori adenovirali "helper"-dipendenti (AdHD), è quella di inserire in questi vettori una minima sequenza di Ad, tale da contenere i segnali sufficienti per la replicazione e l'incapsidamento, mentre tutti gli altri fattori necessari a tali scopi sono forniti in trans da un "helper" adenovirus ricombinante costruito in modo tale che le sue sequenze contenenti segnali di incapsidamento siano facilmente eliminabili in vivo mediante l'uso di sistemi di ricombinazione specifici come il sistema *cre/lox* (W097/32481). In queste strategie il segnale di incapsidamento dell'"helper" è affiancato da due siti di ricombinazione specifici (per esempio *lox*)

orientati nella stessa direzione. L' "helper" è amplificato in cellule competenti che non esprimono la ricombinasi specifica (per esempio cre), per la preparazione dell'AdHD di interesse si infetta o transfetta invece una cellula appositamente selezionata e capace di esprimere la ricombinasi specifica, e si superinfetta quindi con l' "helper".

Queste strategie per la preparazione di virioni di Adenovirus "helper" dipendenti (adenoHD), si basano quindi essenzialmente sull'uso di tre elementi:

linee cellulari trasformate in modo da renderle capaci di esprimere i geni codificati per il gruppo di proteine E1 di adenovirus, e per una ricombinase, solitamente "cre";

un adenovirus "helper", deieto della regione E1 e in cui le sequenze del DNA virale necessarie per il suo incapsidamento nel virione maturo sono fiancheggiati da siti di ricombinazione substrati per la ricombinasi ("lox" in caso di "cre");

il vettore adenoHD che porti il transgene di interesse.

Pur essendo un notevole miglioramento sulle strategie che fanno uso di vettori di prima generazione, questa strategia presenta però alcuni

problemi. Per una produzione su scala farmaceutica, la necessità di controllare tre componenti indipendenti (la linea cellulare, l'"helper" ed il vettore transgenico) porta delle difficoltà difficilmente superabili e costi di produzione inaccettabili.

In primo luogo le ricombinasi tipo cre, catalizzano sia la rimozione che l'inserzione delle regioni di DNA fiancheggiate dai siti lox. La reazione di rimozione è normalmente favorita di 1 a 20 volte, ciò nonostante non si può mai ottenere una rimozione completa dell'"helper" dalla produzione virale. In laboratorio è relativamente agevole separare l'"helper" dal vettore ricombinante di utilità terapeutica, mediante centrifugazione su gradiente isopicnico. Nella pratica farmaceutica ciò è inaccettabile, e la contaminazione con "helper" di preparati di uso terapeutico è un grave problema.

Una seconda limitazione di questo tipo di strategia è dovuta alla difficoltà di ottimizzare i rapporti quantitativi tra virus "helper" e virus "helper" dipendente nel corso del processo di amplificazione. Ne consegue che raramente l'amplificazione del vettore avvicina



all'efficienza di vettori di prima generazione, più comunemente si ottengono produzioni di un ordine di grandezza inferiore. Come nel caso precedente, questo problema emerge drammatico al momento della necessità di produzione su scala industriale, dove i costi diventano praticamente proibitivi.

Per risolvere il problema dovuto alla contaminazione da virus "helper" e ridurre il numero di componenti, una strategia alternativa è quella di ingegnerizzare linee cellulari per renderle capaci di esprimere tutti i fattori necessari all'incapsidamento del virus difettivo.

La possibilità di combinare alcuni di questi elementi in una linea cellulare che esprima in forma stabile gli elementi necessari per la replicazione e l'incapsidamento di virus adenoHD senza richiedere l'uso di un "helper" è di ovvio vantaggio. Per raggiungere tale obiettivo si deve però risolvere il problema della ben nota tossicità intracellulare derivante dalla espressione di geni di adenovirus.

Per esempio in WO98/13499 si propone l'uso di cellule che esprimono varie proteine strutturali di Ad in combinazione tale da non richieder l'uso di virus "helpers".

In queste strategie i geni virali trasfettati nelle cellule possono essere sotto il controllo di promotori diversi, è estremamente difficile però produrre in modo soddisfacente il preciso rapporto che esiste nella infezione naturale con Ad tra replicazione del DNA virale ed espressione delle proteine strutturali. Se ciò non avviene, ne consegue una limitata capacità di produzione.

L'infezione di cellule permissive con Ad5 di tipo selvatico (Ad5wt) risulta comunemente nella produzione di 10^4 - 10^5 particelle virali. Questa produzione massiva è il risultato del coordinamento della replicazione del genoma virale con l'attivazione di quelle sequenze di regolazione ("major late promoter") che caratterizza la fase tardiva del ciclo riproduttivo virale. Questo processo finemente regolato porta all'accumulo di un alto numero di copie di templati trascrittivamente attivi e quindi alla formazione di una alta concentrazione di proteine strutturali necessarie per la produzione di nuove particelle virali. Una linea cellulare "helper" dovrebbe idealmente riprodurre queste condizioni.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione si propone di risolvere il problema di una efficiente produzione di vettori adenovirali difettivi mediante l'uso di una linea cellulare-"helper" che contenga due distinti elementi genomici: il primo, una unità episomale potenzialmente capace di replicarsi, consiste in un vettore che comprende il genoma di Ad5 difettivo solamente per le regioni E1, E4 e per quella contenente il segnale di incapsidamento, il secondo elemento è una unità di trascrizione inducibile comprendente le regioni genomiche E1/E4 ed i geni codificanti per le proteine di regolazione di tale unità trascrizionale.

La prima unità episomiale è ottenuto clonando, in un plasmide che contenga l'origine di replicazione latente del virus di Epstein-Barr (EBV) e il gene per la proteina EBNA-1, il genoma di Ad5 previamente deletato delle regioni E1, E4 e di quella contenete il segnale di incapsidamento. Caratteristica essenziale di tale vettore è la capacità di replicarsi efficacemente in presenza di quantità sufficienti delle proteine codificate da E1 ed E4. Ciò è reso possibile inserendo nel costrutto le sequenze genomiche terminali

inversamente ripetute (ITRs) di Ad5 in configurazione testa-coda. Trasfettato in una cellula di origine umana, tale vettore si mantiene stabilmente come unità episomiale in basso numero di copie all'interno del nucleo, come risultato dell'interazione tra l'origine di replicazione latente di EBV e il transattivatore virale EBNA-1.

La seconda unità genetica inserita nella stessa cellula consiste in un vettore contenente i geni delle regioni E1 ed E4 sotto il controllo di promotore inducibile che sia strettamente regolabile. Questa unità di trascrizione è strettamente mantenuta inattiva durante la fase di crescita della linea cellulare in modo da evitare l'effetto citotossico delle proteine virali.

Allo stadio di produzione virale, si infetta la linea cellulare-"helper" ottenuta dalle operazioni di cui sopra, con il vettore adenovirale difettivo che si intende produrre in grande quantità, ed all' stesso tempo si agisce sul promotore inducibile della seconda unità genetica presente nella cellula. Il risultato di tale azione sarà la produzione delle proteine E1/e4, a cui consegue l'attivazione della cascata trascrizionale di adenovirus associata alla replicazione mediata



dalle ITR del virus della unità episomale. La conseguenza di questa serie coordinata di eventi è l'accumulo di grandi quantità di proteine strutturali del virus in maniera analoga a quanto succede durante l'infezione naturale e la conseguente efficace produzione del vettore virale "helper dependent".

Questa strategia si propone essenzialmente di mimare il fenomeno della latenza virale: nella cellula-"helper" un genoma adenovirale è mantenuto in fase latente mediante soppressione dell'espressione dei geni che sono alla base della cascata trascrizionale di adenovirus. Al momento della infezione/trasformazione con il vettore adenovirale difettivo che si intende produrre viene attivata la fase "litica" mediante induzione dell'espressione delle proteine codificate da E1 ed E4. Il genoma adenovirale prima latente entra in attiva replicazione e trascrizione, ma a venire incapsidato è il solo vettore "helper dependent" (unico a possedere i segnali di incapsidamento) che si intende produrre.

In relazione a quanto esposto oggetto della presente invenzione sono quindi cellule utilizzabili per la produzione di vettori

adenovirali difettivi, caratterizzate dal fatto di contenere unità geniche capaci di esprimere le funzioni necessarie per consentire in dette cellule la produzione di detti virus difettivi, in assenza di "helper". In particolare tali cellule comprendono una prima unità genica codificante in modo strettamente regolato per le funzioni E1 ed E4 di Adenovirus, ed una seconda unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento, laddove tale seconda unità è operativamente collegata ad un primo elemento che garantisce la replicazione di detta seconda unità a basso numero di copie, e ad un secondo elemento che assicura la replicazione di detta seconda unità ad alto numero di copie esclusivamente in presenza delle funzioni E1 ed E4.

Casi particolari sono dati da cellule in cui la prima unità genica comprende un regione codificante per le proteine E1 ed una regione codificante per le proteine E4, operativamente collegate ad almeno un promotore regolabile; cellule in cui in particolare tale promotore è regolato mediante aggiunta di tetraciclina, ecdisone, rapamicina, dexametasone o un metallo

pesante quale Zn o Cd; cellule in cui le regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 sono operativamente collegate a sequenze genomiche che controllano la espressione di dette proteine, ed in particolare il caso in cui tali sequenze sono codificanti per l'operatore della tetraciclina, i promotori regolati dai recettori di ormoni steroidei, il promotore regolato dal recettore dell'ecdisione, il promotore regolato dalla rapamicina e il promotore regolato dalla metallotioenina; cellule in cui almeno una o entrambe le regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 è derivata dal genoma di adenovirus, in particolare adenovirus umano, in particolare adenovirus di sierotipo AD2 o AD5, siano esse derivate da adenovirus dello stesso sierotipo, siano esse derivate da adenovirus di sierotipo tra loro differente; cellule cui la unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento è derivata dal genoma di adenovirus, in particolare adenovirus di mammiferi in particolare adenovirus umano in particolare adenovirus di sierotipo AD2 ed AD5; cellule in cui l'elemento che garantisce la replicazione della

unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento a basso numero di copie è derivato dalle sequenze di origine di replicazione latente del virus di Epstein-Barr (EBV); cellule in cui l'elemento che assicura la replicazione della unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento ad alto numero di copie esclusivamente in presenza delle funzioni E1 ed E4, è derivato dalle sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) di adenovirus, in particolare di mammiferi, in particolare umano e di sierotipo AD2 ed AD5, in posizione testa-coda; cellule in cui almeno una di dette unità geniche è contenuta in almeno un vettore, in particolare plasmide, mantenuto o meno in stato episomale; cellule in cui almeno una di dette unità geniche è contenuta nel genoma della cellula operativamente collegate, o meno, a sequenze genomiche che garantiscono la espressione delle funzioni codificate da almeno una di dette unità in modo controllato.

Tali cellule possono inoltre essere derivate da cellule eucariote, di mammifero, che può essere



anche l'uomo, ed in questo caso anche da cellule permissive per la replicazione di Adenovirus.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo per la produzione delle cellule su menzinate, comprendente le seguenti operazioni in combinazione:

a) introduzione in una linea cellulare di una prima unità genica codificante per le funzioni E1 ed E4 di adenovirus;

b) introduzione nella linea cellulare di cui al punto a) di una seconda unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento.

Casi particolari sono costituiti da un tale metodo in cui la prima unità genica di cui alla operazione a) è contenuta in un vettore; un tale metodo in cui le funzioni E1 ed E4 di cui alla operazione a) sono codificate in modo strettamente regolato; un metodo in cui la seconda unità genica di cui alla operazione b) è contenuta in un vettore; un tale metodo in cui le funzioni di cui alla operazione b) sono codificate in modo strettamente regolato. Anche tali metodi possono essere condotti in particolare su una linea

cellulare eucariote, di mammifero, su una linea cellulare umana ed in particolare sulla linea cellulare A549 (human lung carcinoma ATCC CLL 185).

Ulteriore oggetto della presente invenzione è inoltre l'uso delle cellule su menzionate per la produzione di vettori adenovirali difettivi, in particolare in vitro.

Costituisce inoltre oggetto della presente invenzione un metodo per la produzione di vettori adenovirali difettivi, caratterizzato dal fatto di utilizzare le cellule su menzionate, comprendente, in particolare, le seguenti operazioni in combinazione:

a) coltivazione di dette cellule in condizioni tali da ridurre le funzioni E1 ed E4 di adenovirus in dette cellule;

b) introduzione in dette cellule del DNA codificante per un adenovirus difettivo "helper" dipendente;

c) induzione delle funzioni E1 ed E4 di adenovirus in dette cellule.

Ulteriori casi particolari sono: un tale metodo in cui le funzioni E1 ed E4 di cui alla operazione a) sono svolte dalle proteine E1 ed E4 di adenovirus espresse in dette cellule; un tale

metodo in cui i vettori adenovirali "helper" dipendenti di cui alla operazione b) contengono almeno un gene di interesse terapeutico, i cui prodotti in particolare sono utilizzabili in terapia genica, in particolare diretta contro malattie dell'uomo; un tale metodo in cui i vettori adenovirali "helper" dipendenti di cui alla operazione b) contengono almeno un gene di interesse in procedure di ingegneria genetica o in procedure per la derivazione di animali transgenici; un tale metodo in cui i prodotti dell'attività di detto gene sono peptidi o ribozimi.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono anche gli adenovirus difettivi ottenuti dalle su menzionate cellule, in particolare adenovirus umano. Casi particolari sono costituiti da adenovirus difettivi che contengono almeno un gene codificante per molecole di interesse terapeutico, molecole, che possono anche essere peptidi o ribozimi, in particolare utilizzabili in terapia genica, più in particolare diretta contro malattie dell'uomo.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione il procedimento di produzione di

composizioni, che possono essere farmaceutiche o di materia, comprendenti vettori adenovirali difettivi derivati dalle cellule su menzionate.

L'invenzione sarà meglio descritta con l'aiuto delle figure annesse.

Descrizione delle figure

La figura 1 mostra nei quattro riquadri i diagrammi schematici di vettori utili per la derivazione della linea cellulare-"helper":

A) Diagramma del vettore AD5 "shuttle" (navetta): Ad5 $\Delta\Psi\Delta E1/E4$ rappresenta il genoma di un adenovirus umano completo eccetto che per la delezione delle regioni E1, E4 e di quella contenente il segnale di incapsidamento (Ψ); AdITRs le sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) di Ad5 in configurazione testa-coda; Hygro^r il gene per la resistenza all'igromicina; Amp^r il gene per la resistenza alla ampicillina; EBNA-1 il transattivatore virale del virus di Epstein-Barr (EBV); ed OriP rappresenta l'origine di replicazione latente del virus EBV.

B) Diagramma del vettore E1/E4: dove E1 ed E4 rappresentano sequenze di DNA corrispondenti alle regioni E1 ed E4 di adenovirus, MSC I e II sono delle sequenze contenenti siti



clonaggio ("Multiple Cloning Sites"), PminCMV sono i promotori minimi del Citomegalovirus (CMV), TRE (Tetracycline Responsive Element) rappresenta sette sequenza ripetute dell'operatore del gene della resistenza alla tetraciclina di E Coli.; β -globin polyA è il sito di poliadenilazione della β -globina; ColElori è l'origine di replicazione di E. Coli; SV40 polyA è il sito di poliadenilazione del virus SV40.

C) Diagramma del vettore pTet-On/Off: dove Pcmv e Psv40 sono rispettivamente i promotori di CMV ed SV40, (r)tTa sta ad indicare il transattivatore controllabile della tetraciclina (o l'inverso, cioè quello che viene attivato solo dalla presenza di una tetraciclina). Questo transattivatore è a sua volta composto dal gene che codifica per il repressore della tetraciclina (o il suo mutante rtetR che ha la funzione inversa) fuso con il dominio VP16AD dal virus herpes simplex. Neo^r rappresenta il gene per la resistenza alla neomicina.

D) Diagramma del vettore pTet-KRAB: essenzialmente simile al vettore pTet-On/Off dove le sequenze codificanti per il dominio VP16AD del

virus herpes simplex sono sostituite con quelle del dominio KRAB del gene umano Kox.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Un primo aspetto della presente invenzione comprende un vettore (denominato "shuttle plasmid") che contenga come elementi caratterizzanti:

i) l'origine di replicazione latente del virus di Epstein-Barr (EBV),

ii) il genoma di un adenovirus umano completo eccetto che per la delezione delle regioni E1, E4 e di quella contenete il segnale di incapsidamento,

iii) le sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) di Ad5 in configurazione testa-coda.

Caratteristica essenziale di tale vettore è la capacità di replicarsi riproducendo un alto numero di copie per cellula una volta che la trascrizione dei geni di Ad sia stata attivata da quantità sufficienti delle proteine codificate da E1 ed E4. Ciò è reso possibile dalla inserzione nel costrutto delle sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) di adenovirus in configurazione testa-coda.

In una realizzazione preferita di tale vettore il genoma di Ad è quello del sierotipo Ad5, in una

seconda realizzazione preferita tale vettore contiene il genoma del sierotipo Ad2. Combinazioni con genomi di altri sierotipi sono possibili e potrebbero essere favoriti in alcune applicazioni.

In una realizzazione preferita di tale vettore le sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) sono quelle del sierotipo Ad5, in una ulteriore realizzazione preferita di tale vettore le sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) sono quelle del sierotipo Ad2. Combinazioni con ITRs di altri sierotipi sono possibili e potrebbero essere favorite in alcune applicazioni.

Un secondo aspetto della presente invenzione comprende un vettore che contenga come elementi caratterizzanti:

- i) i geni delle regioni E1 ed E4 di un Ad virus umano,
- ii) un promotore inducibile che sia strettamente regolabile.

Caratteristica essenziale di tale vettore è la capacità di poter essere mantenuto strettamente inattivo durante la fase di crescita della linea cellulare in modo da evitare l'effetto citotossico delle proteine virali.

In una realizzazione preferita di tale vettore le regioni E1 ed E4 di Ad sono quelle del sierotipo Ad5, in una seconda realizzazione preferita di tale vettore le regioni E1 ed E4 di Ad sono quelle del sierotipo Ad2. Combinazioni con regioni E1 ed E4 di altri sierotipi sono possibile e potrebbero essere favorite in alcune applicazioni.

In una realizzazione preferita di tale vettore il promotore inducibile è costituito da un elemento che risponde alla tetraciclina. Il controllo dell'espressione è basato sull'uso sia del transattivatore inverso controllato dalla tetraciclina (rtTA) (Gossen, D. et al. (1995) Science 268:1766-1769) che del repressore trascrizionale ibrido Tet-KRAB (Deuschle, U. et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15:1907-1914) modificato in modo tale da non permettere la formazione di un dimero rtTA/Tet-KRAB. Preferibilmente si prevede l'uso di un vettore contenente un singolo elemento tetraciclina-sensibile in forma di espressione bidirezionale, tale che l'attività basale sia strettamente repressa mediante il repressore TetR-KRAB. In assenza di Doxyciclina il repressore TetR-KRAB si lega strettamente all'elemento tetraciclina-sensibile assicurando una trascrizione



riduzione della attività del promotore. In presenza di Doxyciclina la trascrizione è attivata dal distacco del repressore Tet-KRAB e dal legame al promotore dell'attivatore rtTA. Alternativamente il sistema può essere basato sull'associazione tra una proteina ottenuta fondendo il dominio KRAB responsabile della repressione trascrizionale e il dominio che lega il DNA in presenza di tetraciclina di rtTA ed il transattivatore diretto controllato della tetraciclina tTA. In questa seconda versione del sistema di regolazione, la repressione trascrizionale avviene coltivando le cellule in assenza di tetraciclina.

Altri sistemi di regolazione sono descritti in arte come quelli basati sull'uso di ligandi differenti dalla tetraciclina quali RU486 (Wang, K.E., et al. (1994) PNAS, 91:8180-8184), ecdisone (No, D. et al. (1996) PNAS 93:3346-3351), rapamicina (Spencer, D.M. et al. (1993) Science 262:1019-1024) e il loro uso può essere facilmente adattato nelle presente invenzione. Al fine della presente invenzione qualsivoglia regolatore di espressione genica può essere usato, purchè assicurati una sufficiente regolazione e sia

inducibile mediante l'uso di fattori accettabili nella pratica farmacologica.

Un terzo aspetto della presente invenzione prevede la derivazione di una linea cellulare eucariotica, preferibilmente di mammifero, preferibilmente di origine umana che contenga in forma episomiale stabile un vettore (denominato "shuttle plasmid") come descritto sopra nel primo aspetto della presente invenzione.

Nelle sue realizzazioni preferite questa linea cellulare è preferibilmente la linea A549 (human Lung carcinoma, ATCC CLL185) come descritta in arte, ma altre linee cellulari di origine umana e non, purchè permissive per la replicazione di adenovirus sono contemplate nelle presente invenzione.

Un quarto aspetto della presente invenzione prevede la derivazione di una linea cellulare eucariotica, preferibilmente di mammifero, preferibilmente di origine umana che contenga in forma stabile i geni codificanti per le regioni regioni E1 ed E4 di un Ad virus umano operativamente collegate a sequenze genomiche che ne controllino l'espressione in modo inducibile.

Nelle realizzazioni preferite tale linea cellulare contiene in forma stabile uno o più vettori che comprendono i geni codificanti per le regioni regioni E1 ed E4 di un Ad virus umano come descritti nel secondo aspetto della presente invenzione. In una realizzazione preferita i geni codificanti per le regioni regioni E1 ed E4 sono quelli del sierotipo Ad5 ed il sistema di regolazione di espressione è basato sull'uso sia del transattivatore inverso controllato dalla tetraciclina (rtTA) che del repressore trascrizionale ibrido Tet-KRAB come sopra descritti. Nelle sue realizzazioni preferite questa linea cellulare è preferibilmente la linea A549 (human Lung carcinoma, ATCC CLL185) come descritta in arte, ma altre linee cellulari di origine umana e non permissive per la replicazione di adenovirus sono contemplate nelle presente invenzione.

Un quinto aspetto della presente invenzione prevede la derivazione di una linea cellulare eucariotica, preferibilmente di mammifero, preferibilmente di origine umana che contenga in forma stabile:

i) un vettore (denominato "shuttle plasmid") come descritto sopra nel primo aspetto della presente invenzione,

ii) uno o più vettori che comprendono i geni codificanti per le regioni regioni E1 ed E4 di un Ad virus umano come descritti nel secondo aspetto della presente invenzione.

Nelle sue realizzazioni preferite questa linea cellulare è preferibilmente la linea A549 (human Lung carcinoma, ATCC CLL185), ma altre linee cellulari di origine umana e non permissive per la replicazione di adenovirus sono contemplate nella presente invenzione.

Un sesto aspetto della presente invenzione consiste in un metodo per la produzione di vettori derivati da adenovirus ed "helper" dipendenti, che preveda l'uso di una linea cellulare-"helper" come descritta sopra nel quinto aspetto dell'invenzione, tale metodo essendo caratterizzato dai seguenti passaggi:

a) coltivazione della suddetta linea cellulare-"helper" in condizioni tali da ridurre l'espressione dei geni codificati dalle regioni E1/E4 di adenovirus in detta cellula contenuti.



S.I.B.
ROMA

b) introduzione in detta linea cellulare-
"helper" del DNA codificante per un adenovirus
"helper" dipendente,

c) induzione della espressione dei geni
codificati dalle regioni E1/E4 di adenovirus in
detta cellula contenuti.

In una realizzazione preferita tale metodo è
usato per la produzione di vettori adenovirali
"helper" dipendenti che contengano geni codificanti
per l'espressione di polipeptidi di interesse
terapeutico, preferibilmente per uso in terapia
genica, preferibilmente per uso in terapia genica
dell'uomo.

Si è data finora della presente invenzione una
descrizione di carattere generale. Con l'aiuto dei
seguenti esempi verrà ora fornita una descrizione
più dettagliata di sue specifiche forme di
realizzazione, finalizzate a farne meglio
comprendere scopi, caratteristiche vantaggi e
modalità operative.

ESEMPIO 1: Costruzione dei vettori d'espressione
di E1 ed E4.

Tutti i plasmidi possono essere costruiti
utilizzando le tecniche standard del DNA
ricombinante.

La regione E1 dell'adenovirus 5 e' si può ottenere mediante PCR utilizzando il DNA genomico virale come substrato, e può essere inserita nel plasmide pBI (Baron, U. et al. (1995) Nucleic Acids Res, 23 (17) 3605-3606) contenente un promotore bidirezionale costituito da un singolo tetracycline-responsive element (TRE) fiancheggiato da due cytomegalovirus (CMV) minimal promoters (Clontech) tra i siti di restrizione NotI e SalI generando il plasmide pBI.E1. Successivamente pBI.E1 può essere modificato con l'inserimento del DNA codificante per la regione E4 di adenovirus ottenuta mediante PCR, tra i siti di restrizione MluI e NheI ottenendo il costrutto pBI.E1/E4.

ESEMPIO 2: Costruzione dello "shuttle plasmid"

Un frammento di DNA di 32462 bp contenente l'intero genoma di Adenovirus 5 deletato della regione E1 e del segnale di incapsidazione può essere ottenuto tagliando il plasmide pBHG10 (Bett et al. Proc. Natl Acad Sci. 91:8802-8806; 1994) con gli enzimi di restrizione XbaI e ClaI. Il risultante frammento può essere inserito nel vettore pCEP4 (Invitrogen), contenente l'origine di replicazione di EBV Ori P ed il gene per

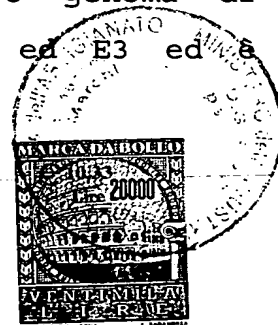
transattivatore virale EBNA-1, tra i siti di restrizione SspBI e BamHI, ottenendo così il plasmide pSC. La regione E4 del genoma di adenovirus può essere successivamente deleta eliminando il frammento di DNA compreso tra i nucleotidi 32810 e 35620 generando il plasmide pSCAE4. Modificazioni di pSCAE4 possono essere introdotte successivamente allo scopo di ottimizzare le caratteristiche del vettore. Ad esempio la reintroduzione nel genoma virale di sequenze derivanti dalla regione E3 di Ad5 wt e che sono state delete nel contesto di pBHG10 può migliorare i livelli d'espressione del gene codificante per la fibra del virus. In aggiunta, un frammento di DNA contenente siti di legame multipli del repressore della tetraciclina (tet-O) possono essere introdotti a monte degli inizi di trascrizione della regione E2 allo scopo di attenuare ulteriormente l'espressione residua del genoma di adenovirus come descritto da Rittner (Rittner K., et al (1997) J. Virol. 71:3307-3311). In questa versione del plasmide shuttle pSCAE4, Tet-KRAB legandosi in assenza di tetraciclina alla regione E2 ne attenua ulteriormente l'espressione.

ESEMPIO 3: Costruzione di una linea cellulare che
esprime proteine di regolazione

Cellule A549 (human Lung carcinoma, ATCC CLL185) che esprimono sia il transattivatore inverso controllato dalla tetraciclina (Gossen, D. et al. (1995) Science 268:1766-1769) che il repressore trascrizionale ibrido Tet-KRAB (Deuschle, U. et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15:1907-1914) possono essere ottenute per cotrasfezione dei due plasmidi pTet-On (Clontech) e pTetKRAB. I cloni cellulari ottenuti per selezione con l'antibiotico G-418 possono essere successivamente testati per valutare l'espressione di entrambe le proteine transregolatrici mediante l'uso di un qualunque vettore in cui sia inserito un gene "reporter" sotto il controllo dell'operatore Tet.

Un vettore adenovirale di prima generazione può essere costruito inserendo nel sito Pac I del plasmide pLBG40 una cassetta di espressione contenente il gene della luciferasi posto sotto il controllo dell'operatore Tet ottenendo il plasmide pLBGluc.

Tale plasmide contiene l'intero genoma di Adenovirus deieto delle regioni E1 ed E3 ed E4



quindi infettivo se introdotto per trasfezione in cellule 293. Il virus (AdLBGluc) contenuto nelle placche che compaiono dopo circa 10 giorni dalla trasfezione di cellule 293 coltivate in monostrato, può essere espanso, titolato e controllato per la sua capacità di esprimere l'enzima luciferasi.

Circa 10^4 cellule di ciascun clone ottenuto per resistenza al G418 possono essere seminate in piastre a 24 pozzetti ed infettate con il virus AdLBGluc ad una molteplicità di infezione di 20. Lo stesso numero di cellule possono essere seminate in duplicato su di una seconda piastra e coltivate in presenza di doxiciclina prima della infezione. 48 ore dopo l'infezione le cellule sono raccolte e lisate. I livelli di espressione del gene della luciferasi sono controllati utilizzando il substrato naturale luciferina. I cloni in cui si osserva il miglior rapporto tra attivazione dell'espressione della luciferasi in presenza di doxiciclina e livello basale di in assenza del ligando sono selezionati ed espansi. Un clone preparato secondo questa procedura, può essere espanso per definire ulteriormente caratteristiche di crescita, stabilità e livelli di espressione delle proteine di regolazione. Opportune banche di

cellule congelate possono essere quindi preparate per assicurare il mantenimento di una linea cellulare in grado di esprimere le proteine regolazione della trascrizione rtTA e Tet-KRAB.

ESEMPIO 4: Costruzione della linea cellulare E1/E4-inducibile.

Il plasmide pBI.E1/E4 (vedi esempio 1) può essere trasfettato nelle cellule del clone precedentemente selezionato, insieme ad un plasmide che esprime la resistenza all'antibiotico puromicina. Le cellule possono essere selezionate per crescita in un terreno contenente l'antibiotico e controllate per la loro capacità di esprimere le proteine "early" di adenovirus in modo controllato dalla tetraciclina. A tal scopo può essere costruito un vettore adenovirale di seconda generazione delecto sia della regione E1 che di quella E4 così come descritto in letteratura (Brough, D.E. et al. (1996) J.Virol. 70:6497-6501). I cloni cellulari ottenuti in seguito alla introduzione nella cellula dell'unità trascrizionale E1/E4 possono essere selezionati sulla base della loro capacità di complementare il vettore adenovirale difettivo permettendone la replicazione. I cloni resistenti alla puromicina

possono essere seminati in piastre a 24 pozzetti in duplicato. Le cellule possono essere quindi infettate con il virus $\Delta E1/E4$ e quindi coltivate con e senza l'aggiunta di doxiciclina al terreno di coltura. In presenza di doxiciclina l'attivazione della trascrizione di E1 ed E4 può rendere le cellule permissive per la replicazione virale e quindi rendere evidente l'effetto citopatico che ne è diretta conseguenza. I cloni, in cui il vettore $Ad\Delta E1/E4$ è in grado di replicare solo in presenza di doxiciclina, possono essere espansi ed ulteriormente caratterizzati determinando livelli di produzione del virus difettivo che sono in grado di sostenere.

ESEMPIO 5: Costruzione della linea cellulare-
"helper".

Il plasmide "shuttle" pSCE $\Delta 4$ può essere introdotto mediante tecniche di trasfezione nella linea cellulare contenente l'unità trascrizionale inducibile E1/E4. I cloni cellulari resistenti ottenuti coltivando le cellule trasfettate in presenza dell'antibiotico hygromycin B possono essere espansi e caratterizzati ulteriormente per la loro capacità di esprimere in modo inducibile i geni di adenovirus e di sostenere la propagazione

di un vettore Ad "helper" dipendente. L'espressione inducibile del genoma adenovirale può essere in primo luogo monitorata valutando l'effetto citopatico che ne è diretta conseguenza coltivando le cellule in presenza di tetraciclina. La produzione delle proteine strutturali di adenovirus può essere determinata quantitativamente con le tecniche di "western blotting" e di immunoprecipitazione con anticorpi specifici già descritti in letteratura. La capacità dei cloni cellulari contenenti l'episoma pSCAE4 di consentire la replicazione di vettori "helper-dependent" può essere studiata utilizzando diversi vettori contenente i geni "reporter" codificanti per la proteina fluorescente verde (GFP= "Green Fluorescent Protein") o per la β -galattosidasi o qualunque altro gene la cui attività possa facilmente essere evidenziata. Le cellule possono essere infettate con differenti moi del virus "helper" dipendente quindi raccolte quando l'effetto citopatico è evidente, dopo l'induzione con tetraciclina dell'espressione del genoma adenovirale. La resa in virus prodotto può essere determinata utilizzando il lisato cellulare come descritto da Parks in PNAS 1996. La valutazione del



rapporto tra il numero di particelle virali trasducenti prodotte infettando le linee cellulari "packaging" e quelle presenti nell'inoculo virale utilizzato può consentire di valutare l'efficienza di produzione di virus dei diversi cloni ottenuti.

Bibliografia

- Baron, U. et al. (1995) *Nucleic Acids Res*, 23 (17) 3605-3606
- Brough, D.E. et al. (1996) *J.Virol.* 70:6497-6501
- Bett et al. *Proc. Natl Acad Sci.* 91:8802-8806; 1994
- Deuschle, U. et al. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:1907-1914
- Englehardt et al. *Proc. Natl Acad Sci.* 91:6196-6200; 1994
- Gossen, D. et al. (1995) *Science* 268:1766-1769
- Hitt M.M. et al. 1997. *Advances in Pharmacol.* 40, 137-206
- Horvitz, "Adenoviridae and their replication" in *Virology*, Field and Knipe, eds. Raven Press, NY; 1990; pg. 1679-1740
- Kozarsky et al. *J. Biol. Chem.* 269:1-8; 1994
- No, D. et al. (1996) *PNAS* 93:3346-3351
- Parks, R. J., L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M. A. Rudnicki, and F. L. Graham (1996). A helper

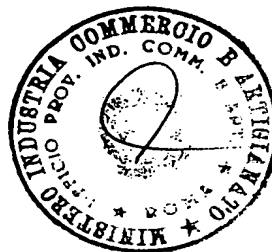
dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13656-13570.

Spencer, D.M. et al. (1993) Science 262:1019-1024

Wang, K.E., et al. (1994) PNAS, 91:8180-8184

Yang et al. Proc. Natl Acad Sci. 91:4407-4411;
1994

Gilberto Tonon
(Isr. Albo n. 83 BM)



S.I.B.
ROMA

RIVENDICAZIONI

1. Cellule utilizzabili per la produzione di vettori adenovirali difettivi, caratterizzate dal fatto di contenere unità geniche capaci di esprimere le funzioni necessarie per consentire in dette cellule la produzione di detti virus difettivi in assenza di "helper".

2. Cellule secondo la rivendicazione 1, comprendenti una prima unità genica codificante in modo strettamente regolato per le funzioni E1 ed E4 di Adenovirus, ed una seconda unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento, detta seconda unità essendo operativamente collegata ad un primo elemento che garantisce la replicazione di detta seconda unità a basso numero di copie, e ad un secondo elemento che assicura la replicazione di detta seconda unità ad alto numero di copie esclusivamente in presenza delle funzioni E1 ed E4.

3. Cellule secondo la rivendicazione 2, in cui detta prima unità genica comprende una regione codificante per le proteine E1 ed una regione codificante per le proteine E4, operativamente collegate ad almeno un promotore regolabile.

4. Cellule secondo la rivendicazione 3, in cui l'attività di detto promotore è regolata mediante un composto scelto dal gruppo comprendente la tetraciclina, l'ecdisione, la rapamicina, il dexametasone.

5. Cellule secondo la rivendicazione 3, in cui l'attività di detto promotore è regolata mediante un metallo pesante scelto dal gruppo comprendente Zn e Cd.

6. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5, dette regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 essendo operativamente collegate a sequenze genomiche che controllano la espressione di dette proteine.

7. Cellule secondo le rivendicazioni 6, in cui le sequenze genomiche che controllano l'espressione della regione E1 oppure E4 sono scelte dal gruppo comprendente le sequenze codificanti per l'operatore della tetraciclina, i promotori regolati dai recettori di ormoni steroidei, il promotore regolato dal recettore dell'ecdisione, il promotore regolato dalla rapamicina e il promotore regolato dalla metallotioenina.

8. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7, in cui almeno una delle



regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 è derivata dal genoma di adenovirus.

9. Cellule secondo la rivendicazione 8 in cui dette regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 sono entrambe derivate dal genoma di adenovirus.

10. Cellule secondo la rivendicazione 8 oppure 9, detto adenovirus essendo adenovirus umano.

11. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 10, detto adenovirus essendo scelto dal gruppo comprendente gli adenovirus di sierotipo AD2 ed AD5.

12. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 11, in cui dette regioni codificanti per le proteine E1 ed E4 sono derivate da adenovirus di sierotipo tra loro differente.

13. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12 in cui la unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento è derivata dal genoma di adenovirus.

14. Cellule secondo la rivendicazione 13 detto adenovirus essendo adenovirus di mammiferi.

15. Cellule secondo la rivendicazione 14, detto adenovirus essendo adenovirus umano.

16. Cellule secondo la rivendicazione 14 oppure 15, detto adenovirus essendo scelto dal gruppo comprendente gli adenovirus di sierotipo AD2 ed AD5.

17. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 16, in cui l'elemento che garantisce la replicazione della unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento a basso numero di copie è derivato dalle sequenze di origine di replicazione latente del virus di Epstein-Barr (EBV).

18. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 17, in cui l'elemento che assicura la replicazione della unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento ad alto numero di copie esclusivamente in presenza delle funzioni E1 ed E4, è derivato dalle sequenze genomiche terminali inversamente ripetute (ITRs) di adenovirus in posizione testa-coda.

19. Cellule secondo la rivendicazione 18 detto adenovirus essendo adenovirus di mammiferi.

20. Cellule secondo la rivendicazione 19, detto adenovirus essendo adenovirus umano.

21. Cellule secondo la rivendicazione 20 detto adenovirus essendo scelto dal gruppo comprendente gli adenovirus di sierotipo AD2 ed AD5.

22. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 21, in cui almeno una di dette unità geniche è contenuta in almeno un vettore.

23. Cellule secondo la rivendicazione 22, detto vettore essendo un plasmide.

24. Cellule secondo la rivendicazione 22 oppure 23, detto vettore essendo mantenuto in stato episomale.

25. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 24, in cui almeno una di dette unità geniche è contenuta nel genoma della cellula.

26. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 25, dette unità geniche essendo operativamente collegate a sequenze genomiche che garantiscono la espressione delle funzioni codificate da almeno una di dette unità in modo controllato.

27. Cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 26, dette cellule essendo cellule eucariote.

28. Cellule secondo la rivendicazione 27, dette cellule essendo cellule di mammifero.

29. Cellule secondo la rivendicazione 28, detto mammifero essendo l'uomo.

30. Cellule secondo la rivendicazione 29, dette cellule essendo cellule permissive per la replicazione di Adenovirus.

31. Metodo per la produzione di cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 30, comprendente le seguenti operazioni in combinazione:

a) introduzione in una linea cellulare di una prima unità genica codificante per le funzioni E1 ed E4 di adenovirus;

b) introduzione nella linea cellulare di cui al punto a) di una seconda unità genica codificante per tutte le funzioni di Adenovirus con la esclusione di E1, E4 e del segnale di incapsidamento.

32. Metodo secondo la rivendicazione 31, detta prima unità genica di cui alla operazione a) essendo contenuta in un vettore.



33. Metodo secondo la rivendicazione 31 oppure 32, in cui le funzioni E1 ed E4 di cui alla operazione a) sono codificate in modo strettamente regolato.

34. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 31 a 33, detta seconda unità genica di cui alla operazione b) essendo contenuta in un vettore.

35. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 31 a 34, in cui le funzioni di cui alla operazione b) sono codificate in modo strettamente regolato.

36. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 31 a 35, in cui la linea cellulare di cui alla operazione a) è una linea cellulare eucariote.

37. Metodo secondo la rivendicazione 36, detta linea cellulare essendo di mammifero.

38. Metodo secondo la rivendicazione 37, detta linea cellulare essendo umana.

39. Metodo secondo la rivendicazione 38, detta linea cellulare essendo la linea cellulare A549.

40. Uso delle cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 30 per la produzione di vettori adenovirali difettivi.

41. Uso secondo la rivendicazione 40, detta produzione essendo in vitro.

42. Metodo per la produzione di vettori adenovirali difettivi, caratterizzato dal fatto di utilizzare le cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 30.

43. Metodo per la produzione di vettori adenovirali secondo la rivendicazione 42, comprendente le seguenti operazioni in combinazione:

a) coltivazione di dette cellule in condizioni tali da ridurre le funzioni E1 ed E4 di adenovirus in dette cellule;

b) introduzione in dette cellule del DNA codificante per un adenovirus difettivo "helper" dipendente;

c) induzione delle funzioni E1 ed E4 di adenovirus in dette cellule.

44. Metodo secondo la rivendicazione 43, dette funzioni E1 ed E4 di cui alla operazione a) essendo svolte dalle proteine E1 e dalle proteine E4 di adenovirus espresse in dette cellule.

45. Metodo secondo la rivendicazione 43 oppure 44, in cui i vettori adenovirali "helper"

dipendenti di cui alla operazione b) contengono almeno un gene di interesse terapeutico.

46. Metodo secondo la rivendicazione 45, in cui i prodotti dell'attività di detto gene sono utilizzabili in terapia genica.

47. Metodo secondo la rivendicazione 46, detta terapia genica essendo diretta contro malattie dell'uomo.

48. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 43 a 47, in cui i vettori adenovirali "helper" dipendenti di cui alla operazione b) contengono almeno un gene di interesse in procedure di ingegneria genetica.

49. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 43 a 48, in cui i vettori adenovirali "helper" dipendenti di cui alla operazione b) contengono almeno un gene di interesse in procedure per la derivazione di animali transgenici.

50. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 45 a 49 in cui i prodotti dell'attività di detto gene sono peptidi.

51. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 45 a 49 in cui i prodotti dell'attività di detto gene sono dei ribozimi.

52. Adenovirus difettivi caratterizzati dal fatto di essere ottenuti dalle cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 30.

53. Adenovirus difettivi secondo la rivendicazione 52, detto adenovirus essendo umano.

54. Adenovirus difettivi secondo la rivendicazione 52 oppure 53, in cui detti adenovirus contengono almeno un gene codificante per molecole di interesse terapeutico.

55. Adenovirus secondo la rivendicazione 54, dette molecole essendo utilizzabili in terapia genica.

56. Adenovirus secondo la rivendicazione 55, detta terapia genica essendo diretta contro malattie dell'uomo.

57. Adenovirus secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 52 a 56 dette molecole essendo peptidi.

58. Adenovirus secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 52 a 56 dette molecole essendo ribozimi.

59. Procedimento di produzione di composizioni comprendenti vettori adenovirali difettivi, caratterizzato dal fatto che detti vettori sono



derivati dalle cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 30.

60. Procedimento secondo la rivendicazione 59, dette composizioni essendo composizioni farmaceutiche.

61. Procedimenti secondo la rivendicazione 59, dette composizioni essendo composizioni di materia.

62. Cellule, loro metodo di produzione, usi, adenovirus e procedimenti come precedentemente descritto esemplificato e rivendicato.

p.p. ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P.
ANGELETTI S.p.A.

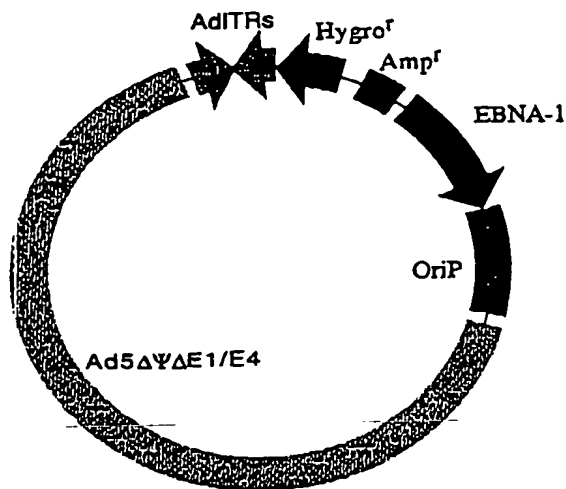
Giulio Tonon
(iscr. Albo n. 83 BM)



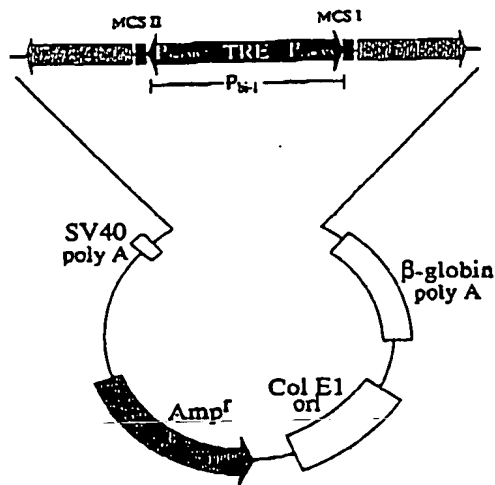
S.I.B.
ROMA

RM 98A000694

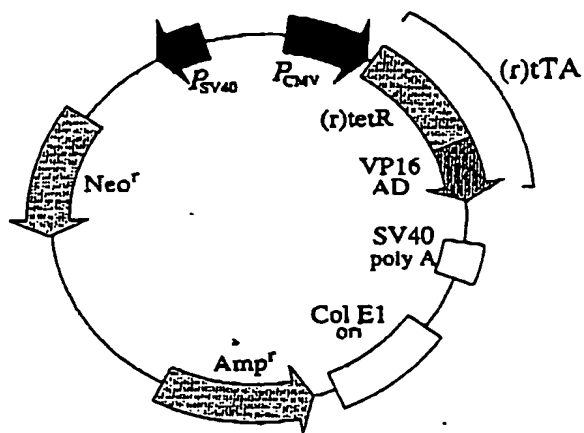
A) Diagramma del vettore Ad5 "shuttle"



B) Diagramma del vettore E1/E4



C) Diagramma del vettore pTet-On/Off



D) Diagramma del vettore pTet-KRAB

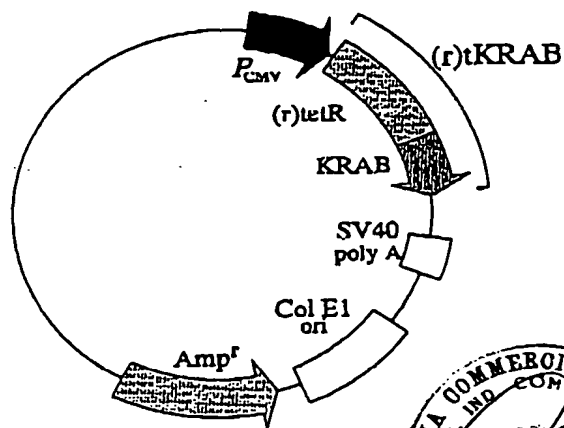


Fig. 1



[Handwritten signature]

THIS PAGE BLANK (USPTO)